

1Cp-6

浸透圧調節物質ベタインの生合成に関与するベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの精製と抗体の調製

高倍鉄子, [○]荒川圭太*, 杉山達夫*, 赤沢堯(名大・農・生化制御, *農化)

ある種の植物は、水分ストレス（または塩ストレス）にตอบสนองして、浸透圧調節物質の一種である betaine（4級アンモニウム化合物）を蓄積することによって、細胞の脱水を防いでいることが知られている。葉において betaine は、choline $\xrightarrow{\text{①}}$ betaine-aldehyde $\xrightarrow{\text{②}}$ betaine という経路を経て生合成される。①、②の段階は、それぞれ choline oxidase と betaine-aldehyde dehydrogenase によって触媒されるが、その酵素学的性質はまだ明確にされていない。

本報告は、ホウレンソウ葉から betaine-aldehyde dehydrogenase を高度に精製し、そのサブユニット構造および酵素学的性質を明らかにし、かつ本酵素に対する特異的抗体を調製した研究結果である。

〔方法〕 市販のホウレンソウ葉（2 kg）を抽出緩衝液中で磨碎し、その磨碎液を 10,000 g で遠心分離して得られた上清を粗抽出液とした。この粗抽出液から 55-70% 飽和硫酸で得られる沈殿を集めたものを透析によって脱塩した後、DEAE-Toyopearl カラムにかけ、0-0.4 M NaCl の直線勾配によって溶出した。酵素活性の高い画分を集め、リン酸緩衝液に透析し、それを hydroxyapatite カラムにかけた。溶出は 10-100 mM リン酸緩衝液の直線勾配で行い、酵素活性の高い画分を集めた。この画分を 70% 飽和硫酸で処理した後、沈殿を緩衝液に溶かして透析した。次にこの酵素液は、Superose12 によるゲルろ過によりさらに精製した。高い酵素活性をもつ画分をさらに FPLC の MONO Q カラムにかけ、0-0.4 M NaCl の直線勾配により溶出した。この高い酵素活性をもつ画分を、高度に精製された最終酵素標品とした。本酵素標品を Native-PAGE にかけたところ、活性染色により染色される蛋白質の他に、わずかに混在する蛋白質バンドが 1-2 本存在することが判明した。活性を有する蛋白質バンドをゲルから切り出し、SDS-PAGE にかけ、betaine-aldehyde dehydrogenase のサブユニット構造を解析した。また本酵素のサブユニットに相当するバンドを SDS-アクリルアミドゲルから切り出した後、ウサギに注射し、抗体を調製した。

〔結果〕 最終精製酵素標品を用いて酵素の kinetics を解析した。betaine-aldehyde に対するみかけの K_m 値は、 1.4×10^{-4} M であった。 NAD^+ と NADP^+ に対する K_m 値は、それぞれ、 3.8×10^{-6} M と 1.0×10^{-3} M であり、 NAD^+ に対する親和性の方が高かった。

Superose12 によるゲルろ過法によってホウレンソウの betaine-aldehyde dehydrogenase の分子量は 120 kDa と推定された。また SDS-PAGE により、本酵素は 60 kDa のサブユニットからなる二量体であることが判明した。60 kDa のサブユニットに対して調製した抗体は、その IgG 画分が betaine-aldehyde dehydrogenase と特異的に反応することを、免疫沈降実験によって確認した。